分子技術在重要作物病原真菌的鑑定與偵測

王智立 [1,2,3,4,*]　**朱皇熹** [1,4]

[1] 國立中興大學植物病理學系。台中市。台灣。

[2] 國立中興大學植物醫學暨安全農業碩士學位學程。臺中市。臺灣。

[3] 國立中興大學永續農業創新發展中心。臺中市。臺灣。

[4] 智慧永續新農業研究發展中心。臺中市。臺灣。

摘要

隨各國人員及農產品的頻繁交流，有害生物跨境的機會增加，植物防檢疫的工作量也隨之增加，準確及快速的鑑別出有害生物一直為植物防檢疫上須面對的課題。近二十年分子技術的進步，使 DNA 解序成本降低，基因序列成為分析物種親緣演化關係的重要依據，利用多位點基因分型的真菌分類、鑑定方法逐漸被廣泛接受後，真菌分類中種的辨識也逐漸由形態種辨識、生物種辨識演變為親緣種辨識，本文以兩屬重要植物病原真菌炭疽病菌(*Colletotrichum*)及鐮孢菌(*Fusarium*)之重要物種，說明親緣種辨識下植物病原菌物種概念學名的演替。並彙整前人研究闡述 effector 基因、toxin 生合成基因、轉座子及基因體資訊於植物病原真菌偵測的應用，及可應用於田間病害檢測的分子技術。

關鍵詞: 真菌鑑定、真菌偵測、親緣種、炭疽病菌、鐮孢菌

前言

由於生物之生長特性、寄生性及生態位等的不同，要瞭解物種間的生態關係及生物特性，必須針對不同物種進行區分及鑑定，因此真菌的分類鑑定一直是真菌學上的重要基礎。其中具有寄生性的真菌可顯著影響人類的生活及經濟活動，隨著世界各國之間的頻繁交流，除了人口的流動，產品的交易也十分龐大，其中農產品就是重要的交易產品之一，也增加有害生物跨境的機率，因此準確及快速的鑑別出有害生物已成為植物防檢疫上須

*論文聯繫人
E-mail: clwang@nchu.edu.tw

不斷提升的方向，也是真菌分類及鑑定上須面對的課題。

長久以來，植物病原真菌種類鑑定主要建立在形態物種辨識(morphological species recognition，簡稱MSR)，依據形態特徵，包含了子實體、產孢構造、產孢方式、孢子以及菌絲等作為鑑定的特徵依據。以 *Colletotrichum* 屬的炭疽病菌為例，形態物種辨識的方法會基於寄主物種、基質、分生孢子大小與形狀、附著器形狀、菌落生長速率、菌落顏色、剛毛的有無、有性態的有無等特徵進行分類(Von Arx 1957)；又如 *Fusarium* 屬的鐮孢菌，則以小孢子的有無與形狀、小孢子的排列方式、大孢子的形狀、大小與隔膜數、大孢子足細胞的形態、厚膜孢子的有無、有性世代及培養基上生長的速度與產生的色素等特性進行鐮孢菌的區分(Nelson *et al*. 1983)；另外部分同種的鐮孢菌(如 *F. oxysporum*)常因具寄主專一性，無法以形態分類方式加以區分，而衍生出依照寄主範圍測試的結果進行分化型(forma specialis)的判定。

然而，上述提到的形態鑑定方法，需要將鑑定物仔細、精確的觀察及測量鑑定物的各部分形態特徵及大小，並與模式標本進行比對，然而模式標本取得不易，增加比對上的困難，加上生長的基質及環境常導致形態上的變異。此外，部分種類需分離出來加以培養後才能進行比較，甚至需完成病原性測試才能有效地進行鑑定。以 *Colletotrichum* 屬的炭疽病菌來說，相同的菌株可能會因為培養條件不一致、菌落與孢子形態可能因菌株變異而發生改變，出現特徵重疊、混淆的情形，即使是分類專家也常感到困擾(Weir *et al*. 2012)，加上炭疽病菌寄主範圍廣泛，能以不同營養型態與多種作物交互作用，無法單純依照寄主進行區分(Johnston *et al*. 2005)。*Fusarium* 屬的鐮孢菌鑑定亦是長久以來的問題之一，一般培養基上具較多鑑別特徵的大孢子不易產生，且產孢形態特徵易受到培養基的影響，因此許多研究建議將菌種培養於 carnation leaf agar 上(Nelson *et al*. 1983)；此外，培養基的成分及光照環境也顯著影響菌株的生長及色素產生，菌落或孢子外觀特徵因為主觀問題而容易導致不同鑑定結果。除了形態特徵判斷不易外，從分離到純培養病原菌、形態特徵的觀察測量，亦或是進行病原性的測試，這些實驗結果都需要耗費相當長的時間，無法有效的消化現代貿易需要進行的檢疫量，因此發展出快速且準確的鑑定方式成了現今的一大課題。

分子技術在病原真菌的鑑定

親緣演化種的緣起與興起

除了上述的MSR，根據同物種生物可相互配對產生有遺傳變異後代的自然特性所使用生物物種辨識(biological species recognition，簡稱BSR)的方法也應用於植物病原真菌的鑑定，如 *Fusarium fujikuroi* 複合種(Hsieh *et al*. 1977; Kuhlman 1982)及

Fusarium solani 複合種(Matuo & Snyder 1973; Van Etten & Kistler 1988)的鑑定曾以 mating population 進行區分，並提供比 MSR 更為細緻的族群鑑別。然而約有 20%的真菌不產生有性態 (Reynolds 1993)，如 *Fusarium oxysporum* 尚未能於實驗室中誘導出有性態，無法以 BSR 進行鑑定；同一屬的菌有些為同絲型(homothallic)真菌，有性態產孢構造的產生無法直接說明是由兩個相互對峙培養的菌株配對產生的，因此 BSR 的鑑定方式無法廣泛應用於真菌的鑑定。近二十年，多基因序列的遺傳分子特徵衍生的親緣物種辨識(phylogenetic species recognition，簡稱 PSR)，由於不具有 BSR 潛在的缺點，所鑑別的種內族群亦與 BSR 所獲得的結果相同，甚或更細緻，使得 PSR 廣泛運用於病原真菌的鑑定。以下以 *Colletotrichum* 及 *Fusarium* 為例說明親緣種辨識對植物病原真菌種的意義的改變。

親緣演化種在重要病原真菌的建立

Colletotrichum

許多 MSR 的 *Colletotrichum* 種類在親緣物種辨識下發現多數為一個複合種(species complex)，甚至包含多個複合種，至 2021 年，*Colletotrichum* 至少可區分出 257 種及 15 個複合種(Talhinhas & Baroncelli 2021)，其中 Gloeosporioides 複合種及 Acutatum 複合種分別為包含物種第一及第二豐富的複合種。

Colletotrichum gloeosporioides 是 Penzig 基於 *Vermicularia gloeosporioides* 的特徵所建立，分離自義大利的柑橘 (Penzig 1882)。之後許多根據形態特徵、培養特性及寄主所建立的 *Colletotrichum* spp. 被合併為 *C. gloeosporioides* (Von Arx & Muller 1954; Von Arx 1957, 1970)，在親緣物種建立以前 *C. gloeosporioides* 已被記錄於 500 種以上的植物。在台灣多數的植物上的炭疽病也記錄由 *C. gloeosporioides* 所引起。Cannon *et al.*(2008) 建立 *C. gloeosporioides* 的詮釋模式(epitype)，使得與 *C. gloeosporioides* 形態相似的親緣種得以被探討。至 2021 年，Gloeosporioides 複合種中包含 57 種，可區分成 Kahawa 支序群(clade)、Musae 支序群及 Theobromicola 支序群。過去許多記錄在 *C. gloeosporioides* 的物種在 PSR 分群下歸屬於 Acutatum 複合種及 Boninense 複合種，即使歸屬於 Gloeosporioides 複合種也不一定是 *C. gloeosporioides*，而是 Gloeosporioides 複合種中的其他種。*C. gloeosporioides* 親緣種建立後的初期，該種僅於柑橘屬、核桃、樹番茄、葡萄、葛藤屬及芒果屬等少數植物上發現(Weir *et al.* 2012)，然而經十多年後，許多植物上紛紛發現該種的存在如: 秋葵、斐濟果、龍眼、茶、辣椒、咖啡、杉木、鐵皮石斛蘭、蛛蜘蘭、酪

梨及蓮霧等數十種植物，顯示 *C. gloeosporioides* 仍為寄主範圍廣泛的病原菌(Talhinhas & Baroncelli 2021)。此外，*Glomerella cingulata* 是 Stoneman (1898)由罹病的歐洲女貞(*Ligustrum vulgare*)莖部分離獲得，並可於培養基上產生子囊殼。根據形態物種辨識 *G. cingulata* 一直被連結為 *C. gloeosporioides* 的有性態 (Small 1926; Von Arx & Muller 1954)，然而親緣物種辨識的結果顯示目前以 PSR 鑑定的 *C. gloeosporioides* 尚未觀察到有性態的產生，因此推測 *C. gloeosporioides* 與 *G. cingulata* 很可能不是同一個物種。*Gloeosporioides* 複合種中的重要物種，包含: *C. kahawae* 主要發現於非洲，可感染發育中的咖啡果造成 CBD (coffee berry disease)，嚴重影響咖啡的生產，對亞洲及美洲的咖啡生產區具檢疫考量(Batista *et al.* 2017)；*C. queenslandicum* 主要分布於澳洲，零星分布於美洲及歐洲，可造成木瓜、酪梨、荔枝、芒果及百香果等作物炭疽病。

C. acutatum 的模式標本是由 Simmonds (1968)所指定，分離自澳洲罹病的木瓜組織。Acutatum 複合種至 2021 年包含 41 種 *Colletotrichum*，可於 171 種植物上發現，亦可感染介殼蟲(Marcelino *et al.* 2008)及海龜(Manire *et al.* 2002)，除 *C. acutatum* 及 *C. fioriniae* 分別為單一種支序群，其餘種可分屬於 3 個支序群，其中 Lupini 支序群主要分布於新熱帶界(neotropical origin)，Nymphaeae 支序群包含最多的物種，主要分布於亞洲及大洋洲，Godetiae 支序群分布於多個地點，惟支序群的代表物種 *C. lupini*、*C. nymphaeae* 及 *C. godetiae* 皆為全球廣泛分布(Talhinhas & Baroncelli 2021)。其中 *C. acutatum* 可感染多種植物，包含草莓、咖啡、哈克木、輻射松及油橄欖等，主要記錄在大洋洲、非洲及地中海地區。*C. fioriniae* 分離自 *Fiorinia externa* (elongate hemlock scale)，並為鐵杉的內生真菌；*C. fioriniae* 亦可造成蘋果、藍莓及蔓越莓果腐，並可分離自多種植物，分布於各大洲，尤其是溫帶地區。*C. godetiae* 主要分布於歐洲之杏仁、草莓、桃、蘋果及橄藍等，並可分離自其他多種植物。*C. nymphaeae* 分布於各大洲，最早紀錄為草莓、蘋果、冬青葉小檗、香葉天竺葵及油橄欖的病原菌，之後於其他多種植物分得；*C. nymphaeae* var. *entomophilum* 為柑橘介殼蟲(*Praelongorthezia praelonga*)之天敵(Wynns *et al.* 2019)。

過去許多炭疽病的病原菌皆紀錄為 *C. gloeosporioides* 及 *C. acutatum*，然而經系統性調查採樣及應用親緣種辨識進行鑑定後，結果常令人意外。以台灣芒果炭疽病為例，收集到的芒果炭疽病菌皆屬於 Gloeosporioides 複合種及 Acutatum 複合種，然而經鑑定後 Gloeosporioides 複合種中的親緣種為 *C. asianum*, *C. fructicola*, *C. siamense* 及 *C. tropicale*，其中又以 *C. asianum* 為主要的病原菌； 另一方面

Acutatum 複合種 的親緣種則有 *C. scovillei* 及 *C. sloani* (Lin 2018; Wu *et al.* 2020)。顯示親緣種概念之 *C. gloeosporioides* 及 *C. acutatum* 雖有廣泛的寄主範圍，且在其他國家曾紀錄於芒果上 (Phoulivong *et al.* 2010; Shivas *et al.* 2016)，但未於台灣所調查的樣品中發現。

Fusarium

F. oxysporum 是由 Schlechtendal 所建立，從腐爛的馬鈴薯塊莖中分離到，特色為大孢子兩端特別尖 (Von Schlechtendal, 1824)。1913 年 Wollenweber (1913)基於相似的小孢子、大孢子形態和大小，將 *F. oxysporum* 與其他 8 個種 *F. tracheiphilum*, *F. vasinfectum*, *F. vasinfectum* var. *inoderatum*, *F. niveum*, *F. lycopersici*, *F. redolens*, *F. orthoceras*, *F. conglutinans* 納入 section Elegans，意指大孢子纖細優美之意，之後 Snyder 和 Hansen (1940)將上述幾個物種併入 *F. oxysporum*，並針對不同的寄主病原性提出了 25 個分化型(formae speciales) (Snyder & Hansen 1940)，這樣的分類形式大多數都被沿用至今，至 2019 年止，有紀錄的分化型大約有 140 多種(Edel-Hermann & Lecomte 2019; Lombard *et al.* 2019)，而結合這些植物病原性的菌株以及被歸類到 *F. oxysporum* 的非病原性菌株和人類病原性菌株就稱為 *F. oxysporum* species complexes (FOSC)。在 2019 年，Lombard 等人指出了儘管分化型的分類方式被應用至今，甚至還加入了 haplotypes、races、及 vegetative compatibility groups (VCGs)作為附加的分類系統，但是由於分化型的分類形式不屬於國際藻類、真菌和植物命名規約 (International Code of Nomenclature for algae, fungi, and plants, ICN）所規範 (McNeill *et al.* 2012; Turland *et al.* 2018)，因此不算是正式的分類命名方式，也不需保存 type 菌株於公認的公共儲存庫中，這些都增加了 FOSC 群的菌株在分類學和命名上的複雜度(Lombard *et al.* 2019)。Lombard 等人利用多基因親緣分析將 91 株 FOSC 群的菌株分成了包含 *F. oxysporum* 的 20 個種，包含 15 個新種，值得注意的是其結果顯示了許多原先不同分化型的菌株在親緣演化的結果上被歸類為同一種，而原本是同一種分化型的菌株則可能分散到許多不同的種之中 (Lombard *et al.* 2019)，這樣的結果在同一年的另一篇重新分類 *F. oxysporum* f. sp. *cubense* 的文獻中也有相似結果，作者將大約 200 株分離自具香蕉黃葉病病徵的菌歸類到 11 個新種中(Maryani *et al.* 2019)，這些研究結果為 FOSC 群的菌株分類開啟了新的里程。

小麥赤黴病(Scab or Fusarium head blight, FHB)為穀類作物的重要病害，不僅造成小麥產量大量的損失，更使得受感染的穀粒遭受真菌毒素的污染而影響人類及動物的食物安全(Miller *et al.* 1991)。引起小麥赤黴

病的 *Fusarium* 有許多種，其中最主要的病原菌為 *F. graminearum* (Windels 2000; Leonard & Bushnell 2003)，而在 2004 年，O'Donnell 等人結合了 11 個基因序列進行親緣演化分析，區分出了 *F. graminearum*、*F. austroamericanum*、*F. meridionale*、*F. boothii*、*F. mesoamericanum*、*F. acaciae-mearnsii*、*F. asiaticum*、*F. cortaderiae* 和 *F. brasilicuml* 等 9 個親緣種(O'Donnell *et al.* 2004)，後續的研究更增加親緣種的數目達 16 種(Sarver *et al.* 2011)，而有趣的是這些分化出的親緣種與分布的地理區域有著密切的關係(O'Donnell *et al.* 2000)，這也代表了不同地理區域的相同病害，可能會有不同的親緣種出現，間接的影響到人們對於目標病害的檢測、防治。

另外，大豆猝死症(sudden death syndrome, SDS)最早於 1971 年美國的阿肯色州(Arkansas)中被觀察到，一開始認定造成之病原菌為 *Fusarium solani*，1997 年命名為 *F. solani* f. sp. *glycines* (Roy 1997; Roy *et al.* 1997)，此病害造成美洲地區大豆產量的極大損失，包含了北美和南美(Roy *et al.* 1997)、阿根廷(Ploper, 1993)、巴西(Nakajima, 1993)、加拿大(Anderson & Tenuta 1998)、巴拉圭(Yorinori 1999)、玻利維亞(Yorinori 2002)、烏拉圭(Ploper *et al.* 2003)，到了 2003 年，Aoki 等人利用 28S rDNA、ITS 和 *TEF-1a* 基因進行親緣演化分析，將 *F. solani* f. sp. *glycines* 菌株重新命名分成北美群的 *F. virguliforme* 以及南美群的 *F. tucumaniae* (Aoki *et al.* 2003)，兩年後再利用前述 3 個基因加上 IGS 進行親緣演化分析，更是將造成大豆猝死症的病原菌分為 4 個種，包含原先的 *F. virguliforme* 和 *F. tucumaniae*，以及兩個新種 *F. brasiliense* 及 *F. cuneirostrum* (Aoki *et al.* 2005)，因此隨著 DNA 親緣演化分析的日益更新，許多原本認為是一種病原菌的病害，逐漸被區分出不同的親緣種。

另一個例子就是造成落葉松潰瘍病的 *Fusarium circinatum*，此病害最早在 1946 年於美國被描述(Gordon *et al.* 2001)，可以造成苗木與成熟樹木的嚴重破壞並死亡，從而導致重大經濟損失(Wingfield *et al.* 2008)，因此是世界多國包含台灣名列的檢疫菌株，值得注意的是該病害在 2015 年的文獻中，利用 *TEF 1-α* and β-tubulin 兩基因將從具有類似落葉松潰瘍病病徵的松樹中分離之鐮刀菌屬菌株進行親緣分析，共可以區分成 10 多種鐮刀菌，其中在 *Fusarium fujikuroi* species complex 裡面有五個種被定為新種，而 *F. marasasianum*、*F. parvisorum* 和 *F. sororula* 經測試其對於垂枝松(*Pinus patula*)的病原性與原本 *F. circinatum* 的病原性相當(Herron *et al.* 2015)，因此從這例子中，可以了解到檢疫清單上的菌株可能會因為更深入的研究而產生新的親緣種，未來應同時對這些有潛在危害風險的新親緣種進行風險評估。

分子技術在病原菌的偵測

Effector genes 在偵測的應用

在許多病原菌中會有其特定的 effector 影響著其對寄主的致病性，其中 Secreted in xylem (*SIX*) 就是一群具有病原性的 *F. oxysporum* 所特有的 effector，這類型 effector 會被病原菌 *F. oxysporum* 分泌至寄主的木質部中故得名，最初在受 *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (*Fol*)感染的番茄植株的木質部汁液中分離到(Rep *et al.* 2002; Jangir *et al.* 2021)，之後經過陸續的研究，目前已經有 14 個主要的 *SIX* 基因被報導(Rep *et al.* 2004; Houterman *et al.* 2007; Van Der Does *et al.* 2008; Schmidt *et al.* 2013)，而這類的基因在其他的分化型中也發現了同源基因的存在(Jangir *et al.* 2021)。多數的 *SIX* 基因功能尚未被詳細研究，不過已有部分研究表明 *SIX* 基因與病原菌的致病力表現有相關聯，在番茄、香蕉及甘藍的研究中， *F. oxysporum* 對應的分化型菌株在剔除掉單一 *SIX* 基因後，突變株對寄主的致病力有顯著的下降(Rep *et al.* 2004; Li *et al.* 2016; Widinugraheni *et al.* 2018)，除了做為影響菌株致病力的因子外，在 *Fol* 的研究中也表明 *SIX1*、*SIX3*、*SIX4* 亦作為 Avirulence (*Avr*)基因可分別誘發番茄的抗性基因 *I-3*, *I-2* and *I-1* (Immunity gene)產生抗病反應 (Rep *et al.* 2004; Houterman *et al.* 2008, 2009)。而結合前述這些結果，越來越多研究發現 *SIX* 基因的組成與序列差異，似乎與 *F. oxysporum* 不同生理小種與分化型的出現有著密切關係，例如 *Fol* 中因為 *Avr1*(*SIX4*)的缺失導致 race2 的出現，而 race2 中的 *Avr2*(*SIX3*)點突變導致了演化出 race3 (Houterman *et al.* 2008, 2009; Takken & Rep 2010; Biju *et al.* 2017)，且不同分化型與生理小種的菌株可能會有不同的 *SIX* 基因組成 (Lievens *et al.* 2009; Carvalhais *et al.* 2019; Batson *et al.* 2020; Jenkins *et al.* 2021; Simbaqueba *et al.* 2021)，推測與 *F. oxysporum* 致病基因產生水平轉移有關(Ma *et al.* 2010; Schmidt *et al.* 2013; Simbaqueba *et al.* 2018)。有趣的是這些 *SIX* 基因在不同分化型或生理小種有獨特的差異，但在相同分化型或生理小種的基因組成或序列裡卻擁有高度的相似性 (Lievens *et al.* 2008, 2009; Czislowski *et al.* 2018; Carvalhais *et al.* 2019; Czislowski *et al.* 2021)，因此針對 *SIX* 基因作為區分鑑定 *F. oxysporum* 的分化型或生理小種是可行的，像是利用感染洋蔥的 *F. oxysporum* f. sp. *cepae* (*Foce*)的 *SIX3* 序列與 *Fol* 的差異，設計了 Real-time quantitative PCR 分子檢測 *Foce* 的工具(Sasaki *et al.* 2015)；或是利用 *F. oxysporum* f. sp. *cubense* (*Foc*)不同生理小種之間 *SIX* 基因序列的差異，設計一套分子診斷 *Foc race* 的工作流程(Carvalhais *et al.* 2019)或可進行區分 *race* 的引子對 (Thangavelu *et al.* 2022)。

toxin 生合成基因在偵測的應用

特定植物病原菌或於農產品儲藏期生長的真菌不但會造成農產品及其衍生物的腐敗，同時還會產生真菌毒素(mycotoxin)汙染農產品影響農產品的品質，常見的例子如 *F. graminearum* 感染小麥、燕麥等穀類作物，引起赤黴病(head blight)，並同時經由新月毒素(trichothecene)的生合成路徑產生脫氧雪腐鐮刀菌烯醇(DON; deoxynivalenol)及雪腐鐮刀菌烯醇(NIV; nivalenol) (Bottalico & Perrone 2002); *Aspergillus flavus* 或 *Aspergillus parasiticus* 感染穀物後產生黃麴毒素(aflatoxin) (Gallagher *et al.* 1978; Dorner *et al.* 1984)；*Penicillium expansum*e 感染蘋果引起青黴病(blue mold of apple)，並產生具有致畸性和致癌性的棒麴毒素(patulin)，汙染蘋果汁(Morales *et al.* 2007)。隨著分子生物學的所建立知識，真菌毒素生合成的相關基因得以被一一的鑑定與證明，由於真菌毒素的生合成基因如同其他的 house-keeping 基因一樣會隨著時間，演化出種的特異性，因此可以利用真菌毒素的生合成基因作為偵測的標的，直接鑑別出生合成真菌毒素的特定真菌，例如: Bluhm *et al.* (2002)利用新月毒素生合成路徑中的轉錄因子(transcriptional activator)*TRI6* 基因設計可鑑別 *F. graminearum* 的專一性引子，利用伏馬鐮孢毒素(fumonisin) 之 polyketide synthase *FUM5* 基因設計可鑑別 *F. verticillioides* 的專一性引子；Dombrink-Kurtzman 和 McGovern (2007)針對 patulin 生合成路徑中的重要酵素基因 isoepoxydon dehydrogenase (*idh*) gene 序列設計具 *P. expansum*e 種專一性的引子。相信未來相關的應用亦將擴展到親緣種的鑑別。

Transposon 在偵測的應用

轉座子是能夠從基因組中的一個位置轉移到另一個位置的基因座上的一段 DNA。幾乎普遍存在於所有生物中，並且佔據物種基因組的一定比例，與生物的演化息息相關，可以促進基因失活、調節基因表達或誘導非常規重組(illegitimate recombination)，轉座子在基因組的存在與組成正是各種生物演化對於保留有用的轉座子以及丟失不利的轉座子所造成的結果(Muñoz-López & García-Pérez 2010)，在一些檢疫上重要的植物病原菌屬如：*Fusarium* (Sperschneider *et al.* 2015)、*Leptosphaeria* (Rouxel & Balesdent 2017) 及 *Verticillium* (Faino *et al.* 2016)等都有文獻提出轉化子幫助病原菌適應環境或是毒力表現，而這些隨病原菌演化至今的不同轉座子或許可以成為設計分子偵測病原菌的參考位置。以 *F. oxysporum* 為例，據統計大約有 5%的基因體顯示由轉座子所組成 (Daboussi & Langin 1994)，更有文獻研究 *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* 的全基因體中有 28%的序列被鑑定是重複序列，其中有許多就是由轉座子所組成(Ma *et al.*

2010)，因此有許多文獻針對 *F. oxysporum* 分化型的偵測或鑑定，就是利用了轉座子本身或附近的區域進行專一性引子對的設計，例如利用轉座子 *impla* 設計 *F. oxysporum* f. sp. *dianthi* 的引子(Chiocchetti *et al.* 1999)，利用轉座子 *Hani* 設計 *F. oxysporum* f. sp. *lactucae* race1 的引子(Pasquali *et al.* 2007)，或是利用轉座子 *han* 和 *skippy* 之間的區域設計了 *F. oxysporum* f. sp. *fragariae* 的引子(Suga *et al.* 2013)、*F. oxysporum* f. sp. *lactucae* race3 的引子則和轉座子 *Gaga* 和 *Gagi* 有關(Gilardi *et al.* 2017)以及轉座子 *hop* 和 *han* 之間的區域設計 *F. oxysporum* f. sp. *lilii* 的引子(Toda *et al.* 2020)。

Genome comparison 在 primer 設計上的應用

隨著次世代與第三代定序技術的發展與成熟，有越來越多的生物體全基因組被定序並上傳到公共數據庫中，因此不論是傳統上利用保守基因或是前述提及的特殊基因如 effector、transposon 等都可利用全基因體的資料進行搜尋以及比對其他非目標菌株，除此之外更可以獲得目標片段前後的 DNA 序列或是非轉錄序列片段進行比較，將有助於精進目標引子對的效用，另外也可藉由全基因體的資料比對尋找尚未被鑑定但具有專一性的候選基因或是非轉錄區域，從中進行專一性引子對的設計，在許多重要的檢疫病原菌像是 *Phytophthora ramorum* 和 *P. lateralis* (Feau *et al.* 2019)、*Verticillium dahlia* (Short *et al.* 2014)、*Leptosphaeria maculans* 與 *L. biglobosa* (Hossain *et al.* 2021)及許多的 *Fusarium oxysporum* 分化型(Suga *et al.* 2013; Ling *et al.* 2016; Kim *et al.* 2017; Burkhardt *et al.* 2019; Thangavelu *et al.* 2022)等，都使用到了全基因體相關的比對資料，綜合上述所言，全基因體的資料對於要針對目標病原真菌進行專一性引子設計是極為重要且實用的工具。

分子技術在病害的診斷

在 1980 年代 PCR 技術的問世，開啟了生物學研究的一扇新大門(Bruce *et al.* 1999)，除了定序特定 DNA 片段進行親源演化分析外，許多技術也發展建立在 PCR 增幅後短時間內肉眼可判讀結果的目標上，包含了隨機擴增多態性 DNA(random amplified polymorphic DNA, RAPD)、限制性片段長度多態性(restriction fragment length polymorphism, RFLP)、擴增片段長度多態性 (amplified fragment length polymorphism, AFLP)以及序列特徵化增幅區域 (sequence characterized amplified region, SCAR)等(Shamim *et al.* 2017)，這些方式可以有效鑑定出一些目標病原菌，但這些技術主要呈現出的是不同菌的多型性圖譜差異，常有再現性低、分析費時等問題(Lievens *et al.* 2008; Hossain *et al.* 2020)，因此人們更進一步利用前述技術或是特定基

因設計專一性的引子，藉由專一性的引子進行 PCR 增幅，達到快速穩定的判讀效果。因此利用具有專一性的引子進行 conventional PCR 偵測檢疫病原菌成了最基礎最廣泛使用的工具之一，例如偵測 *Leptosphaeria maculans* 和 *L. biglobosa* (Liu *et al.* 2006; Fernando *et al.* 2016)、*Verticillium dahlia* (Li *et al.* 1999; Usami *et al.* 2002)以及不同的 *Fusarium oxysporum* 分化型(Shimazu *et al.* 2005; Luongo *et al.* 2012; Kim *et al.* 2017; Gilardi *et al.* 2017)。以設計專一性引子進行 PCR 增幅為基礎，衍伸了更多精進的偵測方式，像是結合多組引子對同時進行增幅的 multiplex PCR，其好處在於第一：可能同時存在一目標樣本的多種病原菌(Ali 2017)，例如以一次反應區分對蕃茄具有病原性的 *Fusarium oxysporum* 分化型以及生理小種(Hirano & Arie 2006)，第二：以一組引子作為內部對照組，可以消除偽陽性或偽陰性的可能性，達到提升專一性引子的效用(Shen, 2019)，像是在檢測甘藍黃葉病 *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans* 時，加入一組 *Fusarium* 屬通用引子即為此目的(Ling *et al.* 2016)。但無論是 conventional PCR 或是 multiplex PCR 技術都只能做到定性而無法做到定量的效果，且需要跑完 PCR 後再進行電泳確認，另外 multiplex PCR 的設計複雜，靈敏度通常不如單組引子的 PCR (Shen 2019)，為了解決這些問題，Real-time PCR 技術就是可以被考慮的，這類技術透過螢光染劑或分子產生的螢光信號會與 PCR 產物分子的數量成正比來測量每個 PCR 循環後的 DNA 量，達到即時偵測與定量 DNA 的目的，在這裡面最常被應用的類型就屬於利用特殊螢光染劑 SYBR green 或是利用螢光探針(probe)相關的 TaqMan probe 及 Molecular Beacon，使用 SYBR green 的檢測成本相對探針技術較為低廉，但探針技術的靈敏度和專一性相對於 SYBR green 則較高(Yadav & Singh 2017)，各有優勢及缺點，研究者可以依照需求而做出不同選擇，像是對於 *F. oxysporum* f. sp. *cepae*、*Verticillium* 使用 SYBR green 的檢測方式(Sasaki *et al.* 2015; Tzelepis *et al.* 2017)；對於 *Phytophthora ramorum* 和 *P. lateralis*、*F. oxysporum* f. sp. *fragariae* 利用 TaqMan probe 進行檢測 (Feau *et al.* 2019; Burkhardt *et al.* 2019)；另外也有研究探討 3 種即時偵測方法偵測 *P. ramorum* 的比較，結果顯示使用 TaqMan probe 的偵測方式有更加靈敏的結果(Bilodeau *et al.* 2007)。

田間診斷工具的開發與應用

在上述許多檢測技術建立起來後，為了符合檢疫需求或商業應用性，偵測植物組織、種子、土壤介質等是否含有目標病原菌成了重要課題，而要克服的首要問題就是植物或土壤中那些可能干擾 PCR 反應的物質，因此許多用於純化 DNA 的試劑套組也隨之發展

(Schrader *et al.* 2012)，在許多植物病原菌偵測的例子中可見，如從種子中檢測重要病原菌 *L. maculans* (Chen *et al.* 2010; Song *et al.* 2016)、及偵測植物組織、土壤、水源中的 *F. oxysporum* f. sp. *cubense* 作為早期預防的措施(Matthews *et al.* 2020)。除了克服干擾 PCR 的物質外，由於大部分 PCR 的技術都建立在對溫度循環、機器等高要求，難以在樣本現場或田間就進行偵測，因此近年來許多攜帶方便、能夠在現場做檢測的技術逐漸被研究及討論，常見用於田間偵測及可等溫增幅(isothermal amplification)的技術有重組酶聚合酶擴增 (recombinase polymerase amplification, RPA)、解旋酶依賴性擴增法 (helicase dependent amplification, HDA) 及恆溫環狀擴增法 (loop-mediated Isothermal amplification, LAMP)，RPA 主要藉由三種在常溫下也具有活性的酶:重組酶(recombinase)、單鏈 DNA 結合蛋白（single-stranded DNA-binding protein, SSB）以及鏈置換 DNA 聚合酶（strand-displacing polymerase）完成常溫 DNA 增幅的目的(Piepenburg *et al.* 2006)，其優點在於反應溫度可在 30 - 42°C 的溫度範圍內進行，換言之就是用手溫握著即可反應，以及通常反應時間約 30 分鐘內即可(Yu *et al.* 2019; Lu *et al.* 2021)，但 RPA 缺點則有對擴增產物的長度有 1500 bp 的限制 (Piepenburg *et al.* 2006)，而用於橫向流動分析 (Lateral Flow Assays, LFA) 的 RPA 其 DNA 產物則通常要求更小(Safenkova *et al.* 2020)，另外 RPA 的另一個限制是因為反應在相對低溫下進行，因此引子錯配 (mismatches)的機率就偏高，這有可能影響了 RPA 增幅的效率以及偽陽性的產生 (Daher *et al.* 2015)，RPA 應用於植物病原真菌偵測的例子不在少數，像是 *Phytophthora* (Yu *et al.* 2019; Lu *et al.* 2021)和 *Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae* (Burkhardt *et al.* 2019)。HDA 最大的特色則是將 DNA 解旋酶(DNA helicase)替代 PCR 中需高溫將雙鏈 DNA 打開的步驟，不同的酶使用可以讓反應在 37°C 或 60-65 °C 進行反應(Vincent *et al.* 2004; An *et al.* 2005)，優點是相較於其他等溫增幅技術其引子設計較為簡易類似於 PCR 引子的設計，但缺點是反應時間通常也需要 1 小時左右(Ivanov *et al.* 2021)以及需要複雜的優化以確保解旋酶和 DNA 聚合酶之間的協調活性(Lau & Botella 2017)，然而 HDA 用於植物病原檢測的研究仍然不多，目前已知有檢測 *Phytophthora* 的應用 (Schwenkbier *et al.* 2015a; 2015b）。而 LAMP 使用兩套或三套引子和具有高鏈置換活性以及複製活性的 DNA 聚合酶進行擴增，與 RPA 不同，反應溫度需在 60-65 °C 效果最佳，且反應時間通常需要 1 小時，優點是所需的設備和反應化合物成本低，但最大的困難在於需要精確的引子設計以及大量的引子選擇(Notomi *et al.* 2000)，不過經過多年的研究，LAMP 技術是三者裡面最常被用在

植物病原真菌檢測的方式，包含了 *Colletotrichum* (Katoh *et al.* 2016; Chen *et al.* 2016)、*Phytophthora* (Hieno *et al.* 2020)、*Leptosphaeria* (Du *et al.* 2021)以及許多 *Fusarium oxysporum* 分化型(Ghosh *et al.* 2015; Lan *et al.* 2018; Katoh *et al.* 2021)。最後這些等溫增幅的技術需要搭配可視化的技術來實現快速判讀結果的目的，常使用的方式包含染色(螢光染劑或沉澱物質)、奈米粒子聚集(nanoparticle aggregation)、橫向流動分析、晶片實驗室(Lab-on-a-chip)等(Ivanov *et al.* 2021)，利用等溫增幅技術進行田間檢測的研究日漸蓬勃，如何克服各自技術的缺點進行優化，並能夠進行多種技術的比較，還有待日後的研究繼續發展。

結語

親緣種辨識利用多位點基因分型以成為真菌分類、鑑定的重要方法，近年來許多的親緣種相繼被發現、建立，導致同一種病害的病原菌種類增加，即使相同的學名，在種的意義上也不同於過去。不同親緣種間的生物意義及於防檢疫上的重要性目前仍不明確，有待未來釐清，然而更新我國的植物病害資料，使國內的學術工作及實務工作與國際接軌，將是未來的一項主要工作。另一方面，快速增加的分子資訊，提供了更多應用於病原菌鑑定的方法及技術，將有助於提升防檢疫工作的效率及準確性。

Acknowledgement

相關研究承蒙科技部計畫 MOST 107-2313-B-005-022、MOST 110-2313-B-005-014-MY3 及 MOST 110-2634-F-005-006 -智慧永續新農業研究發展中心(SMARTer)提供經費協助。

參考文獻

Ali, M. 2017. Detection and Management of Fungal Respiratory Infection by Using Molecular Markers. p. 225-242. *In:* Molecular Markers in Mycology. Fungal Biology. Springer, Cham. *in*: Rice Precision Farming System. (Singh, B. P. and V. K. Gupta, eds.) Taiwan Springer, Cham. Switzerland. 361 pp.

Anderson, T. R. and A. U. Tenuta. 1998. First report of *Fusarium solani* f. sp. *glycines* causing sudden death syndrome of soybean in Canada. Plant Dis. 82: 448–448.

An, L., W. Tang, T. A. Ranalli, H. J. Kim, J. Wytiaz, and H. Kong. 2005. Characterization of a thermostable UvrD helicase and its participation in helicase-dependent amplification. J. Biol. Chem. 280: 28952–28958.

Aoki, T., K. O'Donnell, Y. Homma, and A. R. Lattanzi. 2003. Sudden-death syndrome of soybean is caused by two morphologically and phylogenetically distinct species within the *Fusarium solani* species complex—*F. virguliforme* in North America and *F. tucumaniae* in South America. Mycologia 95: 660–684.

Aoki, T., K. O′ Donnell, and M. M. Scandiani. 2005. Sudden death syndrome of soybean in South America is caused by four species of *Fusarium*: *Fusarium brasiliense* sp. nov., *F. cuneirostrum* sp. nov., *F. tucumaniae*, and *F. virguliforme*. Mycoscience 46: 162–183.

Batista, D., D. N. Silva, A. Vieira, A. Cabral, A. S. Pires, A. Loureiro, L. Guerra-Guimarães, A. P. Pereira, H. Azinheira, P. Talhinhas, M. C. Silva, and V. Várzea. 2017. Legitimacy and implications of reducing *Colletotrichum kahawae* to subspecies in plant pathology. Front. Plant Sci. 7: 2051.

Batson, A. M., L. Fokkens, M. Rep, and L. J. du Toit. 2020. Putative effector genes distinguish two pathogenicity groups of *Fusarium oxysporum* f. sp. *spinaciae*. Mol. Plant Microbe Interact. 34: 141–156.

Biju, V. C., L. Fokkens, P. M. Houterman, M. Rep, and B. J. Cornelissen. 2017. Multiple evolutionary trajectories have led to the emergence of races in *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Appl. Environ. Microbiol. 83: e02548-16.

Bilodeau, G. J., C. A. Lévesque, A. W. A. M. de Cock, C. Duchaine, S. Brière, P. Uribe, F. N. Martin, and R. C. Hamelin. 2007. Molecular detection of *Phytophthora ramorum* by real-time polymerase chain reaction using TaqMan, SYBR Green, and molecular beacons. Phytopathology 97: 632–642.

Bluhm, B., J. Flaherty, M. Cousin, and C. Woloshuk. 2002. Multiplex polymerase chain reaction assay for the differential detection of trichothecene-and fumonisin-producing species of *Fusarium* in cornmeal. J. Food Prot. 65: 1955–1961.

Bottalico, A., and G. Perrone. 2002. Toxigenic *Fusarium* species and Mycotoxins Associated with Head Blight in Small-Grain Cereals in

Europe. Eur. J. Plant. Pathol. 108: 611–624.

Bruce, A., D. Bray, A. Johnson, J. Lewis, M. Rass, K. Roberts, and P. Walter. 1999. Fundamentos da biologia celular: uma introdução à biologia molecular da célula. Porto Alegre: Artmed.

Burkhardt, A., P. M. Henry, S. T. Koike, T. R. Gordon, and F. Martin. 2019. Detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae* from infected strawberry plants. Plant Dis. 103: 1006–1013.

Cannon, P. F., A. G. Buddie, and P. D. Bridge. 2008. The typification of *Colletotrichum gloeosporioides*. Mycotaxon 104: 189–204.

Carvalhais, L. C., J. Henderson, V. A. Rincon-Florez, C. O′ Dwyer, E. Czislowski, E. A. B. Aitken, and A. Drenth. 2019. Molecular Diagnostics of Banana Fusarium Wilt Targeting *Secreted-in-Xylem* Genes. Front. Plant Sci. 10: 547.

Chen, G. Y., C. P. Wu, B. Li, H. Su, S. Z. Zhen, and Y. L. An. 2010. Detection of *Leptosphaeria maculans* from imported Canola seeds. J. Plant Dis. Prot. 117: 173–176.

Chen, Z., X. Liu, Q. Zhang, and B. Li. 2016. Rapid and visual detection of *Colletotrichum gloeosporioides* on *Anoectochilus* using loop-mediated isothermal amplification assay. Int. J. Phytopathol. 5: 99–106.

Chiocchetti, A., I. Bernardo, M. J. Daboussi, A. Garibaldi, M. L. Gullino, T. Langin, and Q. Migheli. 1999. Detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* in carnation tissue by PCR amplification of transposon insertions. Phytopathology 89: 1169–1175

Czislowski, E., S. Fraser-Smith, M. Zander, W. T. O'Neill, R. A. Meldrum, L. T. T. Tran-Nguyen, J. Batley, and E. A. B. Aitken. 2018. Investigation of the diversity of effector genes in the banana pathogen, *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, reveals evidence of horizontal gene transfer. Mol. Plant Pathol. 19: 1155–1171.

Czislowski, E., I. Zeil-Rolfe, and E. A. Aitken. 2021. Effector profiles of endophytic *Fusarium* associated with asymptomatic banana (*Musa* sp.) hosts. Int. J. Mol. Sci. 22: 2508.

Daboussi, M. J., and T. Langin. 1994. Transportable element in the fungal plant pathogen *Fusarium*

oxysporum. Genetica 93: 49–59.

Daher, R. K., G. Stewart, M. Boissinot, D. K. Boudreau, and M. G. Bergeron, 2015. Influence of sequence mismatches on the specificity of recombinase polymerase amplification technology. Mol. Cell Probes. 29: 116–121.

Dombrink-Kurtzman M. A., and A. E. McGovern. 2007. Species-specific identification of *Penicillium* linked to patulin contamination. J. Food Protect. 70: 2646–2650.

Dorner, J. W., R. J. Cole, and U. L. Diener. 1984. The relationship of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* with reference to production of aflatoxins and cyclopiazonic acid. Mycopathologia 87: 13–15.

Du, R., T. Luo, J. Zhang, L. Yang, M. Wu, and G. Li. 2021. LAMP detection of the blackleg pathogen *Leptosphaeria biglobosa* 'canadensis'. Crop Prot. 145: 105610.

Edel-Hermann, V., and C. Lecomte. 2019. Current status of *Fusarium oxysporum formae speciales* and races. Phytopathology 109: 512–530.

Faino, L., M. F. Seidl, X. Shi-Kunne, M. Pauper, G. C. van den Berg, A. H. Wittenberg, and B. P. Thomma. 2016. Transposons passively and actively contribute to evolution of the two-speed genome of a fungal pathogen. Genome Res. 26: 1091–1100.

Feau, N., D. I. Ojeda, S. Beauseigle, G. J. Bilodeau, A. Brar, S. Cervantes-Arango, A. L. Dale, B. Dhillon, C. Hammett, P. Herath, S. F. Shamoun, C. K. M. Tsui, P. Tanguay, and R. C. Hamelin. 2019. Improved detection and identification of the sudden oak death pathogen *Phytophthora ramorum* and the Port Orford cedar root pathogen *Phytophthora lateralis*. Plant Pathol. 68: 878–888.

Fernando, W. D., X. Zhang, and C. C. Amarasinghe. 2016. Detection of *Leptosphaeria maculans* and *Leptosphaeria biglobosa* causing blackleg disease in canola from Canadian canola seed lots and dockage. Plants 5: 12.

Gallagher, R. T., J. L. Richard, H. M. Stahr, and R. J. Cole. 1978. Cyclopiazonic acid production by aflatoxigenic and non-aflatoxigenic strains of *Aspergillus flavus*. Mycopathologia

66: 31–36.

Ghosh, R., A. Nagavardhini, A. Sengupta, and M. Sharma. 2015. Development of Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) assay for rapid detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*-wilt pathogen of chickpea. BMC Res. Notes 8: 1–10.

Gilardi, G., S. Franco Ortega, P. C. J. Van Rijswick, G. Ortu, M. L. Gullino, and A. Garibaldi. 2017. A new race of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* of lettuce. Plant Pathol. 66: 677–688.

Gordon, T. R., A. J. Storer, and D. L. Wood. 2001. The pitch canker epidemic in California. Plant Dis. 85: 1128-1139.

Herron, D. A., M. J. Wingfield, B. D. Wingfield, C. A. Rodas, S. Marincowitz, and E. T. Steenkamp. 2015. Novel taxa in the *Fusarium fujikuroi* species complex from *Pinus* spp. Stud. Mycol. 80: 131–150.

Hieno, A., M. Li, A. Afandi, K. Otsubo, H. Suga, and K. Kageyama. 2020. Detection of the genus *Phytophthora* and the species *Phytophthora nicotianae* by LAMP with a QProbe. Plant Dis. 104: 2469–2480.

Hirano, Y., and T. Arie. 2006. PCR-based differentiation of *Fusarium oxysporum* ff. sp. *lycopersici* and *radicis-lycopersici* and races of *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*. J. Gen. Plant Pathol. 72: 273–283.

Hossain, M. A., M. S. Hossen, and M. R. Karim. 2020. Molecular markers: Indispensable tools for genetic diversity analysis and crop improvement biotechnology. Int. J. Plant Breed. Crop. Sci. 7: 613–623.

Hossain, M. R., M. J. Ferdous, M. I. J. Denison, J. I. Park, H. J. Jung, H. T. Kim, and I. S. Nou. 2021. Whole-genome alignment-based development of molecular markers for detecting *Leptosphaeria maculans* and *Leptosphaeria biglobosa*, the causal agents of blackleg disease in Brassicas. J. Phytopathol. 169: 283–294.

Houterman, P. M., D. Speijer, H. L. Dekker, C. G. de Koster, B. J. Cornelissen, and M. Rep. 2007. The mixed xylem sap proteome of *Fusarium oxysporum*–infected tomato plants. Mol. Plant Pathol. 8: 215–221.

Houterman, P. M., B. J. Cornelissen, and M. Rep. 2008. Suppression of plant resistance gene-based immunity by

a fungal effector. *PLoS Pathogens.* 4: e1000061.

Houterman, P. M., L. Ma, G. Van Ooijen, M. J. De Vroomen, B. J. Cornelissen, F. L. Takken, and M. Rep. 2009. The effector protein *Avr2* of the xylem-colonizing fungus *Fusarium oxysporum* activates the tomato resistance protein I–2 intracellularly. Plant J. 58: 970–978.

Hsieh, W. H., S. N. Smith, and W. C. Snyder. 1977. Mating groups in *Fusarium moniliforme*. Phytopathology 67: 1041–1043.

Ivanov, A. V., I. V. Safenkova, A. V. Zherdev, and B. B. Dzantiev. 2021. The potential use of isothermal amplification assays for in-field diagnostics of plant pathogens. Plants 10: 2424.

Jangir, P., N. Mehra, K. Sharma, N. Singh, M. Rani, and R. Kapoor. 2021. Secreted in Xylem Genes: Drivers of Host Adaptation in *Fusarium oxysporum*. Front. Plant Sci. 12: 628611.

Jenkins, S., A. Taylor, A. C. Jackson, A. D. Armitage, H. J. Bates, A. Mead, R. A. Harrison, and J. P. Clarkson. 2021. Identification and expression of *Secreted in xylem* pathogenicity genes in *Fusarium oxysporum* f. sp. *pisi*. Front Microbiol. 12: 788.

Johnston, P. R., S. R. Pennycook, and M. A. Manning. 2005. Taxonomy of fruit-rotting fungal pathogens whats really out there? N. Z. Plant Prot. 58: 42–46.

Katoh, H., T. Fukuda, H. Nishigawa, and T. Natsuaki. 2016. Rapid detection of *Colletotrichum gloeosporioides* in infected strawberry plants using loop-mediated isothermal amplification. J. Gen. Plant Pathol. 82: 190–198.

Katoh, H., S. Yamazaki, T. Fukuda, S. Sonoda, H. Nishigawa, and T. Natsuaki. 2021. Detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae* by using loop-mediated isothermal amplification. Plant Dis. 105: 1072–1079.

Kim, H., S. M. Hwang, J. H. Lee, M. Oh, J. W. Han, and G. J. Choi. 2017. Specific PCR detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *raphani*: a causal agent of Fusarium wilt on radish plants. Lett. Appl. Microbiol. 65: 133–140.

Kuhlman, E. G. 1982. Varieties of

Gibberella fujikuroi with anamorphs in *Fusarium* section *Liseola*. Mycologia 74: 759–768.

Lan, C., H. Ruan, X. Yang, J. Yao, and J. Jiang. 2018. Development of a loop-mediated isothermal amplification assay for sensitive and specific detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum* Owen. Phytoparasitica 46: 283–293.

Lau, H. Y., and J. R. Botella. 2017. Advanced DNA-based point-of-care diagnostic methods for plant diseases detection. Front. Plant Sci. 8: 2016.

Leonard, K. J., and W. R. Bushnell. 2003. *Fusarium Head Blight of Wheat and Barley*. American Phytopathological Society, USA, 512 pages.

Lievens, B., M. Rep, and B. P. Thomma. 2008. Recent developments in the molecular discrimination of *formae speciales* of *Fusarium oxysporum*. Pest Manag. Sci. 64: 781–788.

Lievens, B., P. M. Houterman, and M. Rep. 2009. Effector gene screening allows unambiguous identification of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* races and discrimination from other *formae speciales*. FEMS Microbiol. Lett. 300: 201–215.

Li, E., G. Wang, J. Xiao, J. Ling, Y. Yang, and B. Xie. 2016. A *SIX1* homolog in *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans* is required for full virulence on Cabbage. PloS One 11: e0152273.

Li, K. N., D. I. Rouse, E. J. Eyestone, and T. L. German. 1999. The generation of specific DNA primers using random amplified polymorphic DNA and its application to *Verticillium dahliae*. Mycol. Res. 103: 1361–1368.

Lin, W. L. 2018. *Phylogenetic Species and Biological Characteristics of Mango Anthracnose Pathogens in Taiwan.* Master Thesis. National Chung Hsing University, Taichung, Taiwan.

Ling, J., J. Zhang, F. Zeng, Y. Cao, B. Xie, and Y. Yang. 2016. Comparative genomics provide a rapid detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans*. J. Integr. Agric. 15: 822–831.

Liu, S. Y., Z. Liu, B. D. Fitt, N. Evans, S. J. Foster, Y. J. Huang, A. O. Latunde-Dada, and J. A. Lucas. 2006. Resistance to *Leptosphaeria maculans* (phoma stem canker) in *Brassica napus* (oilseed rape)

induced by *L. biglobosa* and chemical defence activators in field and controlled environments. Plant Pathol. 55: 401–412.

Lombard, L., M. Sandoval-Denis, S. C. Lamprecht, and P. W. Crous. 2019. Epitypification of *Fusarium oxysporum*–clearing the taxonomic chaos. Persoonia 43: 1–47.

Luongo, L., S. Vitale, A. Haegi, and A. Belisario. 2012. Development of SCAR markers and PCR assay for *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* race 2-specific detection. J. Plant Pathol. 94: 193–199.

Lu, X., H. Xu, W. Song, Z. Yang, J. Yu, Y. Tian, M. Jiang, D. Shen, and D. Dou. 2021. Rapid and simple detection of *Phytophthora cactorum* in strawberry using a coupled recombinase polymerase amplification–lateral flow strip assay. Phytopathol. Res. 3: 1–8.

Ma, L. J., H. C. Van der Does, K. A. Borkovich, J. J. Coleman, M. J. Daboussi, A. Di Pietro, M. Dufresne, M. Freitag, M. Grabherr, B. Henrissat, P. M. Houterman, S. Kang, W. B. Shim, C. Woloshuk, X. Xie, J. R. Xu, J. Antoniw, S. E. Baker, B. H. Bluhm, A. Breakspear, D. W. Brown, R. A. E. Butchko, S. Chapman, R. Coulson, P. M. Coutinho, E. G. J. Danchin, A. Diener, L. R. Gale, D. M. Gardiner, S. Goff, K. E. Hammond-Kosack, K. Hilburn, A. Hua-Van, W. Jonkers, K. Kazan, C. D. Kodira, M. Koehrsen, L. Kumar, K. H. Lee, L. Li, J. M. Manners, D. Miranda-Saavedra, M. Mukherjee, G. Park, J. Park, S. Y. Park, R. H. Proctor, A. Regev, M. C. Ruiz-Roldan, D. Sain, S. Sakthikumar, S. Sykes, D. C. Schwartz, B. G. Turgeon, I. Wapinski, O. Yoder, S. Young, Q. Zeng, S. Zhou, J. Galagan, C. A. Cuomo, H. C. Kistler, and M. Rep. 2010. Comparative genomics reveals mobile pathogenicity chromosomes in *Fusarium*. Nature 464: 367–373.

Manire, C. A., H. L. Rhinehart, D. A. Sutton, E. H. Thompson, M. G. Rinaldi, J. D. Buck, and E. Jacobson. 2002. Disseminated Mycotic Infection Caused by *Colletotrichum acutatum* in a Kemp’s Ridley Sea Turtle (*Lepidochelys kempi*). J. Clin. Microbiol. 40: 4273–4280.

Marcelino, J., R. Giordano, S. Gouli, V. Gouli, B. L. Parker, M. Skinner, D. TeBeest, and R. Cesnik. 2008.

Colletotrichum acutatum var. *fioriniae* (teleomorph: *Glomerella acutata* var. *fioriniae* var. nov.) infection of a scale insect. Mycologia 100: 353–374.

Maryani, N., L. Lombard, Y. S. Poerba, S. Subandiyah, P. W. Crous, and G. H. J. Kema. 2019. Phylogeny and genetic diversity of the banana Fusarium wilt pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* in the Indonesian centre of origin. Stud. Mycol. 91: 79–99.

Matthews, M. C., D. Mostert, P. Ndayihanzamaso, L. J. Rose, and A. Viljoen. 2020. Quantitative detection of economically important *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* strains in Africa in plants, soil and water. PloS One 15: e0236110.

Matuo, T., and W. C. Snyder 1973. Use of morphology and mating populations in the identification of formae speciales in *Fusarium solani*. Phytopathology 63: 562–565.

McNeill, J., F. R. Barrie, W. R. Buck, V. Demoulin, W. Greuter, D. L. Hawksworth, P. S. Herendeen, S. Knapp, K. Marhold, J. Prado, W. F. Prud'homme van Reine, G. F. Smith, J. H. Wiersema, and N. J. Turland. 2012. International Code of Nomenclature for algae, fungi, and plants (Melbourne Code). Gantner Verlag KG [Regnum Vegetabile no. 154].

Miller, J. D., R. Greenhalgh, Y. Wang, and M. Lu. 1991. Trichothecene chemotypes of three *Fusarium* species. Mycologia 83: 121–130.

Morales, H., S. Marín, A. Rovira, A. J. Ramos, and V. Sanchis. 2007. Patulin accumulation in apples by *Penicillium expansum* during postharvest stages. Lett. Appl. Microbiol. 44: 30–35.

Muñoz-López, M., and J. L. García-Pérez. 2010. DNA transposons: nature and applications in genomics. Curr. Genomics 11: 115–128.

Nakajima, T. 1993. Occurrence of soybean sudden death syndrome caused by Fusarium solani in Brazil. p.79. *In:* 7th International Fusarium Workshop, Pennsylvania State University, University Park, PA.

Nelson, P. E., T. A. Toussoun, and W. F. O. Marasas. 1983. Fusarium species: an illustrated manual for identification. University Park, PA: Penn State University Press. 193 pp.

Notomi, T., H. Okayama, H. Masubuchi, T. Yonekawa, K. Watanabe, N. Amino, and T. Hase. 2000. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. Nucleic Acids Res. 28: e63.

O'Donnell, K., H. C. Kistler, B. K. Tacke, and H. H. Casper. 2000. Gene genealogies reveal global phylogeographic structure and reproductive isolation among lineages of *Fusarium graminearum*, the fungus causing wheat scab. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 97: 7905–7910.

O'Donnell, K., T. J. Ward, D. M. Geiser, H. C. Kistler, and T. Aoki. 2004. Genealogical concordance between the mating type locus and seven other nuclear genes supports formal recognition of nine phylogenetically distinct species within the *Fusarium graminearum* clade. Fungal Genet. Biol. 41: 600–623.

Pasquali, M., F. Dematheis, M. L. Gullino, and A. Garibaldi. 2007. Identification of race 1 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* on lettuce by inter-retrotransposon sequence-characterized amplified region technique. Phytopathology 97: 987–996.

Penzig, O. A. J. 1882. Funghi agrumicoli. Contribuzione allo studio dei funghi parassati degli agrumi. Michelia 2: 385–527.

Phoulivong, S., L. Cai, H. Chen, E. H. C. McKenzie, K. Abdelsalam, E. Chukeatirote, K. D. Hyde. 2010. *Colletotrichum gloeosporioides* is not a common pathogen on tropical fruits. Fungal Divers. 44: 33–43.

Piepenburg, O., C. H. Williams, D. L. Stemple, and N. A. Armes. 2006. DNA detection using recombination proteins. PLoS Biol 4: e204.

Ploper, D. 1993. Síndrome de la muerte súbita: nueva enfermedad de la soja en el noroeste argentino. Avance Agroindustrial Ano 13: 5–9.

Ploper L. D., J. T. Yorinori, and W. Morel Paiva. 2003. Importancia de las enfermedades de la soja en el Mercosur. p. 163–174. *In*: Actas Simposio Internacional sobre Soja, XI Congreso de AAPRESID, Rosario, Argentina, August 26-29, Tomo II. (in Spanish).

Rep, M., H. L. Dekker, J. H. Vossen, A. D. de Boer, P. M. Houterman, D. Speijer, J. W. Back, C. G. De Koster, and B. J. Cornelissen. 2002. Mass

spectrometric identification of isoforms of PR proteins in xylem sap of fungus-infected tomato. Plant Physiol. 130: 904–917.

Rep, M., H. C. Van der Does, M. Meijer, R. van Wijk, P. M. Houterman, H. L. Dekker, C. G. de Koster, and B. J. C. Cornelissen. 2004. A small, cysteine-rich protein secreted by *Fusarium oxysporum* during colonization of xylem vessels is required for *I-3*-mediated resistance in tomato. Mol. Microbiol. 53: 1373–1383.

Reynolds, D. R. 1993. The fungal holomorph: An overview. p. 15-25. *In*: The Fungal Holomorph: Mitotic, Meiotic and Pleomorphic Speciation in Fungal Systematics. (D. R. Reynolds and J. W. Taylor, Eds.), CAB International, Wallingford, UK. 375 pp.

Rouxel, T., and M. H. Balesdent. 2017. Life, death and rebirth of avirulence effectors in a fungal pathogen of Brassica crops, *Leptosphaeria maculans*. New Phytol. 214: 526–532.

Roy, K. W. 1997. *Fusarium solani* on soybean roots: nomenclature of the causal agent of sudden death syndrome and identity and relevance of *F. solani* form B. Plant Dis. 81: 259–266.

Roy, K. W., D. E. Hershman, J. C. Rupe, and T. S. Abney. 1997. Sudden death syndrome of soybean. Plant Dis. 81: 1100–1111.

Safenkova, I. V., A. V. Ivanov, E. S. Slutskaya, A. V. Samokhvalov, A. V. Zherdev, and B. B. Dzantiev. 2020. Key significance of DNA-target size in lateral flow assay coupled with recombinase polymerase amplification. Anal. Chim. Acta. 1102: 109–118.

Sarver, B. A., T. J. Ward, L. R. Gale, K. Broz, H. C. Kistler, T. Aoki, P. Nicholson, J. Carter, and K. O'Donnell. 2011. Novel Fusarium head blight pathogens from Nepal and Louisiana revealed by multilocus genealogical concordance. Fungal. Genet. Biol. 48: 1096–107.

Sasaki, K., K. Nakahara, M. Shigyo, S. Tanaka, and S. I. Ito. 2015. Detection and quantification of onion isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae* in onion plant. J. Gen. Plant Pathol. 81: 232–236.

Schmidt, S. M., P. M. Houterman, I. Schreiver, L. Ma, S. Amyotte, B.

Chellappan, S. Boeren, F. L. Takken, and M. Rep. 2013. MITEs in the promoters of effector genes allow prediction of novel virulence genes in *Fusarium oxysporum*. BMC Genomics 14: 119.

Schrader, C., A. Schielke, L. Ellerbroek, and R. Johne. 2012. PCR inhibitors–occurrence, properties and removal. J. Appl. Microbiol. 113: 1014–1026.

Schwenkbier, L., S. Pollok, S. König, M. Urban, S. Werres, D. Cialla-May, K. Weber, and J. Popp. 2015a. Towards on-site testing of *Phytophthora* species. Anal. Methods 7: 211–217.

Schwenkbier, L., S. Pollok, A. Rudloff, S. Sailer, D. Cialla-May, K. Weber, and J. Popp. 2015b. Non-instrumented DNA isolation, amplification and microarray-based hybridization for a rapid on-site detection of devastating *Phytophthora kernoviae*. Analyst 140: 6610–6618.

Shamim, M., P. Kumar, R. R. Kumar, M. Kumar, R. R. Kumar, and K. N. Singh. 2017. Assessing fungal biodiversity using molecular markers. p. 305–333. *In:* Molecular Markers in Mycology. Fungal Biology. Springer, Cham. *in*: Rice Precision Farming System. (Singh, B. P. and V. K. Gupta, eds.) Taiwan Springer, Cham. Switzerland. 361 pp.

Shen, C. H. 2019. Chapter 9 Amplification of Nucleic Acids. *Diagnostic Molecular Biology*. Cambridge, MA: Academic Press: 215–247.

Shivas, R. G., Y. P. Tan, J. Edwards, Q. Dinh, A. Maxwell, V. Andjic, J. R. Liberato, C. Anderson, D. R. Beasley, K. Bransgrove, L. M. Coates, K. Cowan, R. Daniel, J. R. Dean, M. F. Lomavatu, D. Mercado-Escueta, R. W. Mitchell, R. Thangavel, L. T. T. Tran-Nguyen, and B. S. Weir. 2016. *Colletotrichum* species in Australia. Australas. Plant Pathol. 45: 447–464.

Shimazu, J., N. Yamauchi, T. Hibi, M. Satou, S. Horiuchi, and T. Shirakawa. 2005. Development of sequence tagged site markers to identify races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae*. J. Gen. Plant Pathol. 71: 183–189.

Short, D. P., S. Gurung, K. Maruthachalam, Z. K. Atallah, and K. V. Subbarao. 2014. *Verticillium dahliae* race 2-specific PCR reveals a high frequency of race 2 strains in commercial spinach seed lots and

delineates race structure. Phytopathology 104: 779–785.

Simbaqueba, J., A. M. Catanzariti, C. González, and D. A. Jones. 2018. Evidence for horizontal gene transfer and separation of effector recognition from effector function revealed by analysis of effector genes shared between cape gooseberry and tomato–infecting *formae speciales* of *Fusarium oxysporum*. Mol. Plant Pathol. 19: 2302–2318.

Simbaqueba, J., E. A. Rodriguez, D. Burbano-David, C. Gonzalez, and A. Caro-Quintero. 2021. Putative novel effector genes revealed by the genomic analysis of the phytopathogenic fungus *Fusarium oxysporum* f. sp. *physali* (*Foph*) that infects cape gooseberry plants. Front. Microbiol. 11: 3615.

Simmonds, J. H. 1968. Type speciments of *Colletotrichum gloeosporioides* var. *minor* and *Colletotrichum acutatum*. Qd. J. agric. Anim. Sci. 25: 178.

Small, W. 1926. On the occurrences of a species of *Colletotrichum*. Trans. Br. Mycol. Soc. 11: 1-2.

Snyder, W. C., and H. N. Hansen. 1940. The species concept in *Fusarium*. Am. J. Bot. 64–67.

Song, P. L., M. Jędryczka, W. Irzykowski, M. J. Yan, H. Y. Huangfu, L. F. Hao, Y. Y. Bao, and Z. Q. Li. 2016. Efficient detection of *Leptosphaeria maculans* from infected seed lots of oilseed rape. J. Phytopathol. 164: 1097–1104.

Sperschneider, J., D. M. Gardiner, L. F. Thatcher, R. Lyons, K. B. Singh, J. M. Manners, and J. M. Taylor. 2015. Genome-wide analysis in three *Fusarium* pathogens identifies rapidly evolving chromosomes and genes associated with pathogenicity. Genome Biol. Evol. 7: 1613–1627.

Stoneman, B. 1898. A comparative study of the development of some anthracnoses. Bot. Gaz. 26: 69-120.

Suga, H., Y. Hirayama, M. Morishima, T. Suzuki, K. Kageyama, and M. Hyakumachi. 2013. Development of PCR primers to identify *Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae*. Plant Dis. 97: 619–625.

Takken, F., and M. Rep. 2010. The arms race between tomato and *Fusarium oxysporum*. Mol. Plant Pathol. 11:

309–314.

Talhinhas, P., and R. Baroncelli. 2021. *Colletotrichum* species and complexes: geographic distribution, host range and conservation status. Fungal Divers. 110: 109–198.

Thangavelu, R., E. Edwinraj, M. Gopi, P. Pushpakanth, K. Sharmila, M. Prabaharan, M. Loganathan, and S. Uma. 2022. Development of PCR-Based Race-Specific Markers for Differentiation of Indian *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, the Causal Agent of Fusarium Wilt in Banana. J. Fungi. 8: 53.

Turland, N. J., J. H. Wiersma, F. R. Barbie, W. Greuter, D. L. Hawksworth, P. S. Herendeen, S. Knapp, W-H. Kusber, D-Z. Li, K. Marhold, T. W. May, J. McNeill, A. M. Monro, J. Prado, M. J. Price, and G. F. Smith. 2018. International Code of Nomenclature for algea, fungi, and plants (Shenzhen Code). Koeltz Botanical Books. [Regnum Vegetabile 159].

Toda, T., S. Hanesaka, K. Shishido, S. I. Fuji, and H. Furuya. 2020. Development of specific primers for *Fusarium oxysporum* causing damping off of *Lilium formolongi*. J. Genet. Eng. Biotechnol. 18: 1–6.

Tzelepis, G., S. Bejai, M. N. Sattar, A. Schwelm, J. Ilbäck, J. Fogelqvist, and C. Dixelius. 2017. Detection of *Verticillium* species in Swedish soils using real-time PCR. Arch. Microbiol. 199: 1383–1389.

Usami, T., M. Abiko, M. Shishido, and Y. Amemiya. 2002. Specific detection of tomato pathotype of *Verticillium dahliae* by PCR assays. J. Gen. Plant Pathol. 68: 134–140.

Van der Does, H. C., B. Lievens, L. Claes, P. M. Houterman, B. J. Cornelissen, and M. Rep. 2008. The presence of a virulence locus discriminates *Fusarium oxysporum* isolates causing tomato wilt from other isolates. Environ. Microbiol. 10:1475–1485.

Van Etten, H. D. and H. C. Kistler. 1988. *Nectria haematococca*, mating populations I and VI. Adv. Plant. Pathol. 6:189–206.

Vincent, M., Y. Xu, and H. Kong. 2004. Helicase-dependent isothermal DNA amplification. EMBO Rep. 5: 795–800.

Von Arx, J. A. and E. Müller. 1954. Die Gattung der amerosporen

Pyrenomyceten. Beiträge zur Kryptogamenflora der Schweiz 11: 1–434.

Von Arx, J. A. 1957. Die Arten der Gattung *Colletotrichum* Cda. Phytopathol. Z. 29: 413–468.

Von Arx, J. A. 1970. A revision of the fungi classified as *Gloeosporium*. Bibl. Mycol. 24: 1–203

Von Schlechtendal, D. F. L. 1824. Flora Berolinensis: Pars secunda: cryptogamia (Vol. 2). Ferdinandi Dümmler. 284 pages.

Weir, B. S., P. R. Johnston, and U. Damm. 2012. The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex. Stud. Mycol. 73: 115–180.

Widinugraheni, S., J. Niño-Sánchez, H. C. Van Der Does, P. Van Dam, F. A. García-Bastidas, S. Subandiyah, H. G. J. Meijer, H. C. Kistler, G. H. J. Kema, and M. Rep. 2018. A *SIX1* homolog in *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* tropical race 4 contributes to virulence towards Cavendish banana. PLoS One 13: e0205896.

Windels, C. E. 2000. Economic and social impacts of Fusarium head blight: changing farms and rural communities in the Northern Great Plains. Phytopathology 90: 17–21.

Wingfield M. J., A. Hammerbacher, R. J. Ganley, E. T. Steenkamp, T. R. Gordon, B. D. Wingfield, and T. A. Coutinho. 2008. Pitch canker caused by *Fusarium circinatum*: a growing threat to pine plantations and forests worldwide. Australas. Plant Pathol. 37: 319–334.

Wollenweber, H. W. 1913. Studies on the Fusarium problem. Phytopathology 3: 24–50.

Wu, C.-J., H.-K. Chen, and H.-F. Ni. 2020. Identification and characterization of *Colletotrichum* species associated with mango anthracnose in Taiwan. Eur. J. Plant Pathol. 157: 1–15.

Wynns, A. A., A. B. Jensen, J. Eilenberg, and I. Delalibera Júnior. 2019. *Colletotrichum nymphaeae* var. *entomophilum* var. nov a natural enemy of the citrus scale insect, *Praelongorthezia praelonga* (Hemiptera: Ortheziidae). Sci. Agric. 77: e20180269.

Yadav, M. K. and B. P. Singh. 2017. Real-time polymerase chain reaction (PCR) based identification and detection of fungi belongs to genus Fusarium. p. 65–85. *In:* Molecular Markers in

Mycology. Fungal Biology. Springer, Cham. *in*: Rice Precision Farming System. (Singh, B. P. and V. K. Gupta, eds.) Taiwan Springer, Cham. Switzerland. 361 pp.

Yorinori, J. T. 1999. Situação atual das enfermidades de soja na Bolivia, Brasil e Paraguai. p. 21–25. *In*: Proceedings, Mercosoja 99, Rosario, Argentina, June.

Yorinori, J. T. 2002. Situacao atual das doencas potenciais no cone sur. p.3-6. *In*: Proceedings, II Brazilian Soybean Congress-Mercosoja, Foz do Iguazu, Brazil, June.

Yu, J., D. Shen, T. Dai, X. Lu, H. Xu, and D. Dou. 2019. Rapid and equipment-free detection of *Phytophthora capsici* using lateral flow strip-based recombinase polymerase amplification assay. Lett. Appl. Microbiol. 69: 64–70.

Molecular techniques in identification and detection of important plant pathogens

Chih-Li Wang [1,2,3,4,*] and Huang-Hsi Chu[1,4]

[1]Department of Plant Pathology, National Chung Hsing University, Taiwan.

[2]Master Program for Plant Medicine and Good Agricultural Practice, National Chung Hsing University, Taiwan.

[3]Innovation and Development Center of Sustainable Agriculture, National Chung Hsing University, Taichung, Taiwan.

[4]Smart Sustainable New Agriculture Research Center (SMARTer), Taichung 402, Taiwan.

Abstract

The increasing oversea chances of pests is due to the high frequency of personnel communication and agricultural trade, which also increases the workloads of plant quarantine. Accurate and fast pest identification tools are always demanded in plant quarantine and pest control. Molecular techniques have advanced and significantly decreased the cost of DNA sequencing in recent twenty years. The DNA sequence are used as the fundamental information for the analysis of phylogenetic relationships. Multilocus sequence typing has been widely accepted in fungal classification and identification. The fungal species recognitions gradually evolve from morphologic species recognition and biological species recognition toward phylogenetic species recognition. In this manuscript we used some important species of *Colletotrichum* and *Fusarium*, the two important genera of plant pathogens, to explain the impact of phylogenetic species recognition on species concepts. We also introduce examples that applied the information of effector genes, toxin biosynthesis genes, transposons and genome in plant pathogen detection, and molecular tools that are applicable in on-site disease detection.

*Corresponding author.

E-mail: clwang@nchu.edu.tw

Key words: fungal identification, fungal detection, phylogenetic species, *Colletotrichum, Fusarium*